



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (PhD) رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان:

مقایسه ایزوله های کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) کسب شده از بیمارستان و جامعه از نظر کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (SCC*mec*) و ژن لکوسیدین پانتون- والتین [Panton-Valentine leukocidin (PVL)] در کرمان

توسط: جاوید صادقی

استاد راهنما: دکتر شهلا منصوری

سال تحصیلی: ۱۳۹۱-۱۳۹۲

Comparision of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitalized and community acquired infections for the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) gene in Kerman

A Thesis
Presented to
The Graduate Studies

By

Javid Sadeghi

In Partial Fulfillment
Of the Requirements for the Degree
Doctor of Philosophy in:

Medical Bacteriology

Kerman University of Medical Sciences

August 2013

چکیده

مقدمه و هدف: عفونتهای استافیلوکوکوس اورئوس بویژه عفونتهای ایجاد شده توسط سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین [*Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)] مشکل عمده بهداشتی هستند. MRSA کسب شده از بیمارستان [Hospital-Acquired (HA) MRSA] به آنتی بیوتیکها مقاوم بوده ولی از ویرولانس کمتری برخوردار است در حالیکه MRSA کسب شده از جامعه [Community-Acquired (CA)-MRSA] به آنتی بیوتیکها حساس بوده اما ویرولانس بیشتری دارد. ادغام محتوای ژنتیکی (ژنهای *mecA* و *pvl*) سویه های HA-MRSA و CA-MRSA می تواند منجر به ایجاد سویه های با مقاومت آنتی بیوتیکی بیشتر و ویرولانس بالا شود که این سویه ها می توانند مشکلات عمده ای را در درمان ایجاد بکنند. هدف این مطالعه شناسایی شیوع MRSA و تعیین خصوصیات مولکولی ایزوله های HA-MRSA و CA-MRSA بدست آمده از نمونه های بالینی می باشد.

مواد و روشها: در طول یکسال تعداد ۱۶۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مراجعه کننده به سه بیمارستان در شهر کرمان جمع آوری شد. تمامی ایزوله ها توسط تستهای فنوتیپی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفتند و تایید شناسایی ایزوله ها بوسیله تکثیر ژن *muc* توسط PCR انجام گرفت. برای غربالگری ایزوله های MRSA از تستهای فنوتیپی و برای تایید آن از حضور ژن *mecA* استفاده شد. برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از روش انتشار دیسک استفاده شد. برای تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در برابر آنتی بیوتیکها از نوارهای E-test استفاده شد. تمامی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از نظر وجود ژنهای *mecA* و *pvl* با روش PCR ارزیابی شدند. تیپ بندی کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (*SCCmec*) ایزوله های MRSA با استفاده از روش multiplex-PCR انجام گرفت. تیپ بندی سویه ها با استفاده از متد REP-PCR انجام گرفت.

یافته ها: با استفاده از تکثیر ژن *mecA* بوسیله PCR و مندهای فنوتیپی ۵۶/۸٪ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بعنوان MRSA شناسایی شدند. تمامی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیکهای ونکومايسين و لینزولید حساس بودند. بیشترین میزان مقاومت در ایزوله های HA-MRSA و CA-MRSA به آنتی بیوتیک اریترومايسين به ترتیب با ۴۴/۵۷٪ و

۲۲/۸۲٪ بود. شایعترین تیپ های *SCCmec* شامل تیپ III با ۴۸/۳۱٪ و تیپ های I، V و IV به ترتیب با ۱۹/۱٪، ۱۶/۸۵٪ و ۳/۳۷٪ بودند. در ایزوله های HA-MRSA تیپ *SCCmec* III با ۳۷/۰۸٪ غالب بوده در حالیکه در ایزوله های CA-MRSA تیپ *SCCmec* V با ۱۹/۱٪ غالب بود. ژن *pvl* در ۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس (۳/۰۸٪) شناسایی شد که دو ایزوله MRSA (یک ایزوله HA-MRSA و یک ایزوله CA-MRSA) و سه ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین (MSSA) بودند. با استفاده از REP-PCR، ۹۲ ایزوله MRSA در ۱۰ خوشه قرار گرفتند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و لینزولید موثرترین عوامل ضد باکتریایی بر علیه ایزوله های HA-MRSA و CA-MRSA بوده و اریترومایسین کمترین اثر را داشت. تیپ *SCCmec* III در ایزوله های MRSA در این ناحیه غالب بود. فراوانی ژن *pvl* در کل ایزوله ها ۳/۰۸٪ بود که ۲٪ ایزوله های HA-MRSA و ۲/۸٪ ایزوله های CA-MRSA حاوی ژن *pvl* بودند.

کلمات کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، MRSA، لکوسیدین پانتون-والنتین، *SCCmec*، کرمان

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* infections, particularly infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, are emerging as a major public health problem. Although community-acquired MRSA (CA-MRSA) is typically susceptible to more antibiotics than hospital-acquired MRSA (HA-MRSA), CA-MRSA also tends to be more virulent than HA-MRSA. Combining of HA- and CA-MRSA genome contents (*mecA* and *pvl* genes) have created a super adaptable *S. aureus* strain, which is multidrug resistant and more virulent. Treatment of these strains is difficult.

The aim of this study was to identification the prevalence of MRSA and to determine the molecular characterizations of HA- and CA-MRSA isolates obtained from clinical samples in Kerman.

Methods: Totally 162 *S. aureus* were obtained from clinical samples at three university hospitals in Kerman, Iran from March 2011 to February 2012. All isolates were identified as *S. aureus* by phenotypic methods and confirmed by PCR amplification of the *nuc* gene. MRSA isolates were screened by phenotypic tests and confirmed by presence of *mecA* gene. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the MRSA isolates against antibacterial agents were determined by E-test. All isolates were analyzed by PCR for the presence of *mecA* and *pvl* genes. SCCmec typing of MRSA isolates were performed by multiplex PCR assay. Strain typing was carried out with REP-PCR.

Results: Using *mecA* gene PCR and phenotypic methods 56.8% of the isolates were identified as MRSA. All *S. aureus* isolates (MSSA, HA- and CA-MRSA) were susceptible to vancomycin and linezolid. The highest rates of resistance were against erythromycin in HA-MRSA and CA-MRSA isolates with 44.57% and 22.82%, respectively. The most frequent SCCmec types were type III (48.31%) followed by type V (19.1%), type I (16.85%) and IV (3.37%). SCCmec type III was also predominant in HA-MRSA isolates, while in CA-MRSA isolates SCCmec type V was predominant. The *pvl* gene was detected in 3.08% of isolates (two MRSA and three MSSA isolates). REP-PCR typing divided the 92 MRSA isolates into 10 distinct clusters.

Conclusion: The results of this study indicate that vancomycin and linezolid were the most effective antibacterial agents and erythromycin had the lowest effect against HA- and CA-MRSA isolates. SCCmec type III was predominant in MRSA strains in this area. The *pvl* gene was detected

in 3.08% of *S. aureus* isolates. From which 2% of HA-MRSA and 2.8% of CA-MRSA isolates harbored the *pvl* gene.

Key words: Antibiotic resistance, MRSA, Panton-Valentine leukocidin, *SCCmec*, Kerman.